

**Fluoreszenzmikroskopische
Bestimmung des männlichen Kerngeschlechts
an 1 bis 132 Tage alten Blutspuren**

Irmgard Heinhold

1974

Aus dem Institut für Rechtsmedizin
der Universität München
Direktor: Prof. Dr.med. Wolfgang S P A N N

Fluoreszenzmikroskopische
Bestimmung des männlichen Kerngeschlechts
an 1 bis 132 Tage alten Blutspuren.

Inaugural - Dissertation
zur Erlangung der Doktorwürde in der Zahnheilkunde
verfaßt und einer Hohen Medizinischen Fakultät
der Ludwig Maximilians-Universität zu München



vorgelegt von

IRMGARD HEINHOLD

aus
München
im Jahre
1974

Gedruckt mit Genehmigung der Medizinischen
Fakultät der Universität München.

Berichterstatter: Prof. Dr. Liebhardt

Mitberichterstatter: Prof. Dr. Spann

Dekan: Prof. Dr. Spann

Tag der mündlichen Prüfung: 23. Juli 1974



Titelblatt

Seite

Vorwort

Aufgabenstellung

Eigene Untersuchung

Meinen Eltern .

1) Beschreibung des Gegenstandes

2) Verlauf der Untersuchungen

3) Ergebnisse

Diskussion

Fazit

Literaturverzeichnis

INHALTSANGABE

Seite

Einführung	1
Aufgabenstellung	3
Eigene Untersuchungen	4
a) Untersuchungsmaterial und Methode	4
b) Verlauf der Untersuchungen	6
c) Ergebnisse	8
Diskussion	13
Zusammenfassung	17
Literaturverzeichnis	18

EINFÜHRUNG

Noch vor wenigen Jahren bestand nur die Möglichkeit der positiven Bestimmung des weiblichen Kerngeschlechts. In der weiblichen Zelle ist im Interphasenkern nur eines der beiden geschlechtsbestimmenden X - Chromosomen aktiv, das andere bildet einen auffallenden 0,5 - 1 μ großen Chromatinbrocken, Sexchromatin oder Barrkörperchen, der der Kernmembran innen anliegt. Bei Granulozyten erscheint er als trommelschlegelförmiger Anhang (drumstick) des segmentierten Kernes.

Dem kanadischen Histologen M.L. BARR (2) gelang 1949 der Nachweis dieses Sexchromatins. Er fand, daß Nervenzellen, die aus dem Hirn und dem Rückenmark weiblicher Katzen stammten, nach Färbung mit basischen Farbstoffen dunkle, intranucleäre Körper enthielten, die in ihrer charakteristischen Form in Nervenzellen männlicher Katzen niemals vorkamen.

1953 haben MOORE, GRAHAM und BARR (13) nach weiteren Untersuchungen erkannt, daß das chromosomale Geschlecht auch beim Menschen aus der Chromatinverteilung in den Zellkernen der verschiedensten Organe ersichtlich ist.

Die hämatologische Geschlechtsdifferenzierung geht auf Entdeckungen der englischen Autoren DAVIDSEN und SMITH (6) zurück, die 1954 in nach Jenner-Giemsa gefärbten Blutaussstrichen des weiblichen Geschlechts die sog. drumsticks in polynucleären Leukozyten antrafen. Eine 100%ig eindeutige Geschlechtsdiagnose kann jedoch bei Verwendung dieser Methode nicht gestellt werden, da die Granulozyten des peripheren Blutes nur in 1 - 5% die sog. drumsticks als weibliches Merkmal aufweisen (HIENZ). Lymphozyten zeigen kein Barrbody. Da Granulozyten häufig deformiert vorliegen und, vor allem bei älterem Zellmaterial, durch Chromatinbröckelchen ein Barrkörperchen vorgetäuscht werden konnte (Diskussion bei Helmer) (9), mußte eine neue Methode zur sicheren Geschlechtsdiagnostik von Blutspuren gefunden werden.

Eine Möglichkeit der Bestimmung des männlichen Kerngeschlechts eröffnete sich durch Befunde von CASPERSSON und Mitarbeitern (3,4,5), die Untersuchungen an Chromosomen der Vicia Faba durchführten. Diese Untersuchungen haben gezeigt, daß alkylierende Fluorochrome vom Typus des Quinacrine-Lost, oder auch des Atebrins, einzelne Chromosomen und Chromosomensegmente unterschiedlich, besonders stark aber ein distales Segment am langen Arm des Y - Chromosoms markieren. Diese selektive starke Anfärbung des Y - Chromosoms hat zur Folge, daß sich, auch im Interphasekern, was PEARSON und Mitarbeiter (14) 1970 nachweisen konnten, und vor allem in Zellen mit aufgelockerter Struktur des Zellkerns, das Heterochromatin des Y - Chromosoms als fluoreszierender, stark leuchtender Punkt von ca. 2 - 5 μ Durchmesser deutlich sichtbar abhebt. Damit war eine einfache Methode zur Bestimmung der in der männlichen Zelle enthaltenen Y - Chromosomen gewonnen.

Beim weiblichen Kerngeschlecht fehlen typische Fluoreszenz-körperchen.

Inzwischen wurde das Y - Chromosom u.a. in Spermien (BARLOW und VOSA 1970) (1), in isolierten Zellkernen aus Haut-, Muskel-, Milz-, Leber-, Nierenzellen und Endothelzellen (HERBICH und MEINHART) (10), Haarwurzelzellen (SCHWINGER und Mitarbeiter) (18, 19) und in Zellen des peripheren Blutkreislaufs (POLANI und MUTTON (15), MENDE und ALONSO (12), SCHWINGER (17)) nachgewiesen. E.Schwinger untersuchte eingetrocknete Blutspuren auf verschiedenen Spureenträgern (Leinen, Wolle, Glas, Metall und Holz). Zur Färbung verwendete er eine 0,5%ige wässrige Lösung von Quinacrine-Dihydrochlorid. Mit Lymphozyten wurden jeweils die besten Ergebnisse erzielt.

AUFGABENSTELLUNG

Die eingehende Untersuchung von Blutspuren hat eine große Bedeutung bei der Aufklärung von Verbrechen. Insbesondere die Geschlechtsdiagnostik an Blutspuren spielt in der forensischen Medizin und Spurenkunde eine wichtige Rolle. Als wirklich nutzbringend erweist sich die neue Methode zur Bestimmung des Kerngeschlechts allerdings erst, wenn sich herausstellt, daß eine eindeutige Geschlechtsbestimmung nicht nur an frischen Blutaussstrichen, sondern auch an alten, eingetrockneten und an verschiedenen Objekten (Stoff, Papier, ect.) haftenden Blutspuren möglich ist.

Schwinger (17) beschreibt eine mit Sicherheit nicht eingeschränkte Geschlechtsdiagnose an Blutzellen innerhalb eines Monats. Um zu prüfen, ob die Methode der Fluoreszenzanzufärbung auch noch nach 2, 3 oder 4 Monaten zu einem eindeutigen Ergebnis führt, wurden die in dieser Arbeit beschriebenen Untersuchungen durchgeführt.

EIGENE UNTERSUCHUNGEN

a) UNTERSUCHUNGSMATERIAL und METHODE

Es wurden Blutspuren von 15 verschiedenen Probanden untersucht; davon waren 5 von Frauen und 10 von Männern. Es handelte sich um Blut, das den Probanden für verschiedene Zwecke entnommen und 1 - 3 Tage lang in alkoholischer Lösung aufbewahrt worden war. Von diesen Lösungen wurden einige Tropfen auf Filterpapier aufgebracht. Die Lagerung dieses mit Blut getränkten Filterpapiers erfolgte bei Zimmertemperatur und Tageslicht.

Die Herstellung der Präparate ist einfach und wurde in Anlehnung an Beschreibungen von SCHWINGER (17) und FRÜND, KOSKE-WESTPHAL, FUCHS-MECKE und PASSARGE (7,8) durchgeführt.

Es wird jeweils ein Stückchen Filterpapier mit physiolog. Kochsalzlösung getränkt. Nach mehrmaligem Zusammenfalten legt man das Papier auf einen Objektträger und kann ohne Schwierigkeiten das gelöste Blut mit einem Glasstab auspressen und ausstreichen. Die Objektträger wurden vorher in Äthyläther gelegt, um sie von Fett und anderen Verunreinigungen zu befreien. Das angetrocknete Blut wird mit 25%iger Essigsäure kurz überschichtet, die Erythrocyten hämolysieren und werden nach einer halben Minute zusammen mit der Essigsäure mit einem Filterpapier aufgesaugt. Der so vorbereitete Objektträger wird nun für 15 Minuten in einer 0,01%igen Lösung von Quinacrine mustard gefärbt und anschließend ca. 5 Minuten lang in stehendem Leitungswasser gewässert.

Zur Herstellung der Färbelösung wird der Fluoreszenzfarbstoff Quinacrine mustard (Fa.Serva) in Phosphat-Citrat-Puffer nach Mc Ilvaine (pH 4,4) in einer Konzentration von 0,1 mg/ml gelöst. Die Aufbewahrung erfolgt unter Lichtabschluß bei 5° C im Kühlschrank .

Nach erfolgter Wässerung wird der Objektträger mit Fließpapier getrocknet und mit Phosphatpuffer (pH 7,0) eingedeckt.

Um einen luftdichten Abschluß zu erreichen, kann der Rand des Deckglases noch mit Nagellack bestrichen werden.

Zur Untersuchung wurde das LEIZ WETZLAR Auflichtfluoreszenzmikroskop "ORTHOLUX II" mit Binokulartubus, einer Quecksilber-Höchstdrucklampe HBO 50 W und den Filtern BG 38 blau und KH 510 verwendet. Die Präparate wurden unter fluoreszenzfreier Ölimmersion ($n_D = 1,515$; $v = 49$) bei 220- und 1000-facher Vergrößerung betrachtet.

b) VERLAUF der UNTERSUCHUNGEN

Es wurden in einem Zeitraum von 4 Monaten 120 Präparate untersucht, darunter waren 10 frische Blutausschläge, der Rest bestand aus Blutspuren, deren Alter zwischen 10 und 530 Tagen lag. Zunächst wurden bekannte frische Blutausschläge betrachtet, um mit dem mikroskopischen Bild vertraut zu werden. In den ersten Präparaten fanden sich nur sehr wenige Zellen. Dafür kann folgende Ursache vermutet werden: beim Herstellen der Präparate wurde der mit dem luftgetrockneten Blut behaftete Objektträger ca. 2 - 3 Minuten in Essigsäure getaucht, wobei offenbar nicht nur Hämolyse der Erythrocyten stattfand, sondern auch eine Ablösung der Leukozyten erfolgte. Durch das Übergehen zur oben beschriebenen Methode (kurze Übersichten mit Essigsäure) konnte diese Schwierigkeit beseitigt werden.

Ein weiteres Problem ergab sich bei der Ablösung des Blutes vom Filterpapier, die anfänglich mit Phosphatpuffer (pH 7,0) erfolgte. Es zeigte sich, daß die so hergestellten Präparate wenig Zellen enthielten, wodurch eine eindeutige Diagnosestellung wesentlich erschwert wurde. Auch der Versuch, das Blut mit dest. Wasser abzulösen, war wenig erfolgreich. Erst die Verwendung von physiolog. Kochsalzlösung brachte gute Ergebnisse. Das Blut konnte mit NaCl ohne Schwierigkeiten vom Filterpapier gelöst werden. In jedem Präparat fanden sich 40-50 Zellen. Diese Zahl ist, wie sich bei den Blindversuchen zeigte, zur sicheren Geschlechtsbestimmung völlig ausreichend.

Auf der Suche nach der besten Methode wurde auch noch die Technik der Zellgewinnung durch Zentrifugieren erprobt. 4 Stückchen Filterpapier, 2 mit einer männlichen und 2 mit einer weiblichen Blutspur versehen, wurden 24 Stunden lang in physiolog. Kochsalzlösung bzw. Phosphatpuffer (pH 7,0) gelegt. Nach dieser Zeit hatte sich das Blut weitgehend vom Filterpapier gelöst. Diese Lösung wurde 4 Minuten lang zentrifugiert, die überstehende Flüssigkeit abgesaugt und der Rückstand auf einen Objektträger gebracht. Während des Zentrifugierens fand bereits Hämolyse

statt und es wurden in keinem der nach bereits beschriebener Methode aus dem Rückstand hergestellten Präparate Zellen gefunden. Es ist daher anzunehmen, daß der Rückstand nur aus Verunreinigungen bestand. Eventuell vereinzelt darin enthaltene Leukozyten sind möglicherweise beim Übertragen auf den Objektträger verloren gegangen. Diese Methode ist, wie sich zeigte, sehr aufwendig und zur Zellgewinnung ungeeignet.

Nachdem die beste Herstellungsmethode ermittelt, und die anfänglichen Schwierigkeiten bei der Unterscheidung der Fluoreszenzkörperchen von den auch in Präparaten weiblicher Blutspuren auftretenden Artefakten beseitigt waren, wurden alle folgenden Untersuchungen in Form von Blindversuchen durchgeführt.

In unregelmäßigen Zeitintervallen von anfangs 3 - 14 Tagen, später 2 - 10 Tagen wurden jeweils mindestens 3 Präparate untersucht. Es war dem Betrachter nicht bekannt, wieviele dieser Präparate von Blutspuren männlicher und wieviele von Blutspuren weiblicher Probanden angefertigt waren. Pro Präparat wurden durchschnittlich 25 - 35 Zellen beurteilt. Dabei wurden Zellen mit Fluoreszenzkörperchen als positiv, Zellen ohne Fluoreszenzkörperchen als negativ in eine Tabelle eingetragen. Fragliche Zellen wurden negativ gewertet. Gemäß der Aufgabenstellung erfolgten diese Untersuchungen an Blutspuren, die zwischen 10 und 132 Tage alt waren.

Zusätzlich wurden noch fünf Präparate mit einem Alter von 426 Tagen und zwei 530 Tage alte Präparate ebenfalls im Blindversuch betrachtet. Drei dieser Blutspuren befanden sich auf Filterpapier, vier auf Stoffresten.

Um weitere Möglichkeiten des Anfärbens zu erproben, wurden 8 Präparate von einer Blutspur eines männlichen Probanden angefertigt. Das Alter dieser Blutspur betrug 132 Tage.

Die Präparate wurden folgendermaßen gefärbt:

2 Präparate:	Atebrin	0,5%
2 " :	Quinacrine mustard	0,1%
2 " :	" "	0,05%
2 " :	" "	0.01% (Standardlösung)

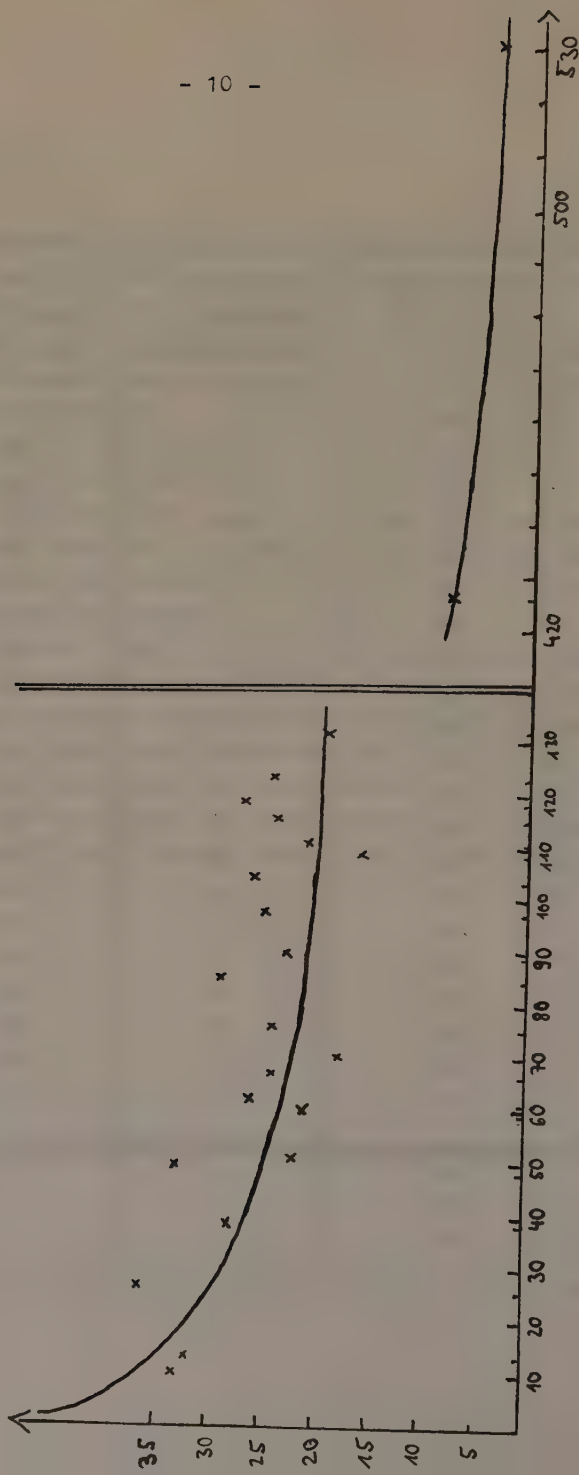
c) ERGEBNISSE

In frischen Blutaussstrichen männlicher Individuen fanden sich in den Zellkernen von 50 - 70% der Leukozyten typische, stark fluoreszierende Körperchen. Mit zunehmendem Alter der Blutspuren nimmt die Häufigkeit des Fluoreszenzkörperchens in Zellen männlicher Probanden ab. Innerhalb der ersten 50 Tage waren noch über 30 von 100 männlichen Zellen fluoreszenzpositiv. Bei Blutspuren mit einem Alter von 50 - 132 Tagen lag der Prozentsatz bei durchschnittlich 20 - 25. Die 426 bzw. 530 Tage alten Blutspuren ließen ein deutliches Absinken des Prozentsatzes erkennen. In weniger als 10 von 100 männlichen Zellen konnte ein eindeutiges Fluoreszenzkörperchen gefunden werden.

In der folgenden Tabelle sind die Ergebnisse der gesamten, an Blutspuren männlicher Individuen durchgeführten Untersuchungen in einem repräsentativem Teilausschnitt zusammengefaßt. Sämtliche Blutspuren sind, mit Ausnahme der 426 und 530 Tage alten, auf Filterpapier aufbewahrt worden. Wie bereits erwähnt wurden alle Präparate im Blindversuch geprüft und jedesmal eine richtige Geschlechtsdiagnose gestellt.

Alter der Blutspur (Tg.)	Anzahl der geprüften Zellen	eindeutig positive Y-Fluoreszenz	Fluores- zenzkörper- chen (%)
10	27	9	33
13	25	8	32
25	32	11	34
38	35	10	28
48	39	13	33
50	27	6	22
59	33	7	21
61	35	9	26
66	25	6	24
70	34	6	18
75	21	5	24
84	21	6	29
89	35	8	23
97	36	9	25
103	23	6	26
108	25	4	16
111	24	5	21
115	42	10	24
118	29	8	27
122	37	9	24
132	26	5	19
426	43	3	7
426	44	4	9
530	49	2	4

Wareszenz =
 örperchen (%)

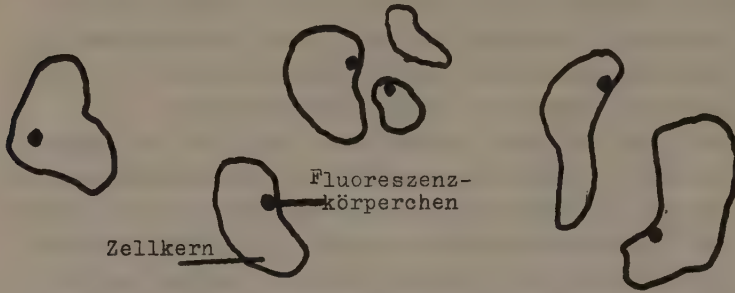


Es muß darauf hingewiesen werden, daß mit steigendem Alter der Blutspur nicht nur der Prozentsatz absinkt, sondern auch die Leuchtkraft des Y-Chromosoms nachläßt. Innerhalb der ersten 4 Monate ist das Nachlassen der Leuchtintensität allerdings so geringfügig, daß es die Diagnosestellung nicht beeinträchtigt. Erst bei den Blutspuren, die über ein Jahr alt waren, machte es sich negativ bemerkbar.

Auffallend war der große Unterschied, der sich bei gleich alten Blutspuren verschiedener männlicher Individuen sowohl in Bezug auf die Prozentzahl, als auch in Bezug auf die Leuchtkraft des Fluoreszenzkörperchens ergab. Es wurden zum Beispiel 2 Blutspuren, die beide 84 Tage alt waren, aber von verschiedenen Probanden stammten, untersucht, wobei sich einmal ein Prozentsatz von 25, das andere Mal ein Prozentsatz von 33 ergab. In die Tabelle (Seite 9) wurden als Durchschnittswert 29% eingetragen. Ebenso wurde in allen anderen Fällen verfahren.

Bei Frauen wurden zum Teil fluoreszenzkörperchenähnliche Gebilde beobachtet, die als Artefakte gedeutet werden können und die Diagnosestellung für den geübten Beobachter nicht beeinträchtigen. Die Häufigkeit dieser stark aufleuchtenden homogenen Gebilde (siehe Abschnitt Diskussion) liegt bei 2 - 3%. Im Mikroskop ergibt sich bei Blutspuren männlicher Probanden etwa folgendes Bild: der Zellkern ist gut als hell leuchtendes Gebilde zu erkennen, in dem sich ein intensiv aufleuchtender Punkt, das Y-Chromosom, befindet. Ein Unterschied in Form und Struktur der Zellkerne von Blutspuren weiblicher beziehungsweise männlicher Individuen ist nicht festzustellen. Es liegen meist 2 - 3 Zellen neben-, manchmal auch übereinander, was die Identifizierung des Fluoreszenzkörperchens erschwert. Aber auch Einzelzellen treten auf. Die Form entspricht der bekannten Zellkernform von Lymphozyten (rund) bzw. Granulozyten (segmentiert). Die Struktur stellt sich als inhomogen (gekörnelt oder auch feinetzig) dar, mit helleren und dunkleren Abschnitten. Das Fluoreszenzkörperchen ist meist randständig lokalisiert,

kann aber vereinzelt auch mittelständig angetroffen werden. Seine Form ist rund bis länglich oval, häufig findet man auch die von SCHWINGER (17) angegebene sichelförmige Gestalt.



Man sieht, daß alle möglichen Variationen auftreten, und folglich einige Übung erforderlich ist, um eine sichere Diagnose stellen zu können.

Ergebnis der verschiedenen Färbemethoden:

Bei der Färbung der Blutspuren mit Quinacrine mustard, das mit Mc Ilvaine's Puffer auf 0,1% bzw. 0,05% verdünnt worden ist, wurden keine guten Ergebnisse erzielt. Die Zellgrenzen waren verschwommen. Vereinzelt leuchtete ein Y - Chromosom auf, allerdings sehr schwach.

Die mit Atebrin (= Quinacrinedihydrochlorid) in 0,5%iger wässriger Lösung gefärbte Blutspur ließ eine eindeutige Geschlechtsdiagnose zu. Die Qualität dieser Präparate entsprach etwa der Qualität der Präparate, die mit 0,5%igem Quinacrine mustard hergestellt worden waren. Es wurde lediglich eine geringfügige, für die Diagnosestellung unbedeutende Differenz in der Leuchtkraft des Fluoreszenz-körperchens bemerkt.

DISKUSSION

Eine eindeutige Geschlechtsdiagnose ist auf Grund der Untersuchungen und Ergebnisse an weißen, aus eingetrockneten Blutspuren gewonnenen Blutzellen innerhalb von 132 Tagen mit 100%iger Sicherheit möglich. Das Auftreten von durchschnittlich 20% fluoreszenzpositiven Zellen bei Männern, läßt auch beim Vorhandensein von Artefakten eine zuverlässige Unterscheidung der beiden Geschlechter zu. Das relativ langsame Absinken des Prozentsatzes in dem Zeitraum zwischen 50 und 130 Tagen läßt vermuten, daß noch bei wesentlich älteren Blutspuren eine sichere Geschlechtsbestimmung durchgeführt werden kann. Es wurden auch tatsächlich, wie bereits beschrieben, Blutspuren mit einem Alter von 426 bzw. 530 Tagen richtig diagnostiziert. Da allerdings, wie schon im Abschnitt Ergebnisse erwähnt, nur in 2 bis 4 Zellen pro Präparat ein eindeutiges Fluoreszenzkörperchen gefunden wurde, und somit die Differenz zwischen der Häufigkeit der bei Frauen auftretenden fluoreszenzkörperchenähnlichen Gebilde (2 - 3%) und der in diesen Präparaten gefundenen fluoreszenzkörperchenpositiven Zellen (4 - 9%) sehr gering ist, kann die Geschlechtsdiagnose höchstens mit 70 -80%iger Sicherheit gestellt werden. Hier sind neue Untersuchungen von 1 Jahr und länger gelagerten Blutspuren notwendig.

Es zeigt sich also, daß mit zunehmendem Alter der Blutspur immer größere Erfahrung und Sicherheit des Beobachters erforderlich sind. Voraussetzung für die richtige Beurteilung älterer Blutspuren ist außerdem das Vorhandensein von mindestens 40 Zellen pro Präparat.

Für das Absinken des Prozentsatzes der Fluoreszenzkörperchen können folgende Möglichkeiten angegeben werden: entweder lösen sich mit zunehmendem Alter der Zellen post mortem Chromatinstrukturen auf, oder die spezifische Anfärbbarkeit des Y - Chromosoms geht bei erhaltenem Heterochromatin verloren (SCHWINGER) (17). In einer Arbeit von

G.SCHAI DT und A.KRÜ GER (16) werden weniger primäre Veränderungen im Zellkern, als vielmehr artifizielle Strukturveränderungen durch den besonders für ältere Zellen stärker störend wirkenden Resuspensionsvorgang für das Absinken verantwortlich gemacht.

Auf zwei Schwierigkeiten, die bei der Anfertigung der Präparate entstanden, wurde bereits im Kapitel "Verlauf der Untersuchungen" hingewiesen.

Das erste Problem tauchte bei der Ablösung des Blutes vom Filterpapier auf. Nach mehreren Versuchen mit Phosphatpuffer bzw. dest. Wasser, die schlechte Ergebnisse brachten, erwies sich die Verwendung von physiolog.Kochsalzlösung als erfolgreiche Methode. SCHWINGER kratzte bei seinen Untersuchungen die Blutspur mit einem feinen Skalpell von der Stoffprobe ab. Auch SCHAI DT und KRÜ GER (16) beschreiben eine mechanische Aufbereitung der Blutspuren auf Stoff. Zusätzlich wurde das Material noch mit zellfreiem Serum resuspendiert. Bei Blutproben, die sich auf Filterpapier befinden, kommt das Abkratzen mit dem Skalpell jedoch nicht in Frage, da man auf diese Weise durch die Zellstoffasern stark verunreinigte Präparate erhalten würde. Auch zum Herauslösen des Blutes aus Stoff hat sich die Verwendung von physiolog. Kochsalzlösung bestens bewährt.

Das zweite Problem bildete die Fixierung mit 25%iger Essigsäure. Bei einer Fixierungsdauer von 2 - 3 Minuten wurden nicht nur die Erythrozyten zerstört, sondern es ging auch eine erhebliche Anzahl von weißen Blutkörperchen verloren. Erst nachdem das auf dem Objektträger angetrocknete Blut nur kurz (40 - 60 Sekunden) mit Essigsäure überschichtet wurde, konnte die für eine sichere Diagnosestellung erforderliche Anzahl von Zellen gefunden werden. Deshalb ist es erstaunlich, daß G.SCHAI DT und A.KRÜ GER (16) in ihrer Arbeit eine Fixierungsdauer von mindestens 3 Min. angeben. Vielleicht gelang es ihnen bei der Aufbereitung der Blutspuren so viele Zellen auf den Objektträger zu bringen, daß sich der Verlust einiger Leukozyten bei der Fixierung nicht nachteilig aus-

wirkte. SCHWINGER (17) macht keine Angaben über die Fixierungsdauer.

Bei den vereinzelt in weiblichen Zellen auftretenden fluoreszenzkörperchenähnlichen Gebilden handelt es sich um kleine leuchtende Partikel, die zum Teil chromatindichten Kernstrukturen entsprechen, oder sich als Artefakte, wie Fetttröpfchen, sowie Glasverunreinigungen der Objektträger identifizieren lassen. Es wurden auch zellkernähnliche Gebilde mit leuchtenden Punkten beobachtet. Die Unterscheidung zwischen diesen Gebilden und den echten Blutzellkernen gelang nach einiger Übung anhand folgender Kriterien: meist leuchteten die Partikel, die in Größe und Form etwa den Zellkernen der weißen Blutkörperchen entsprachen, wesentlich intensiver auf; zudem zeigten sie eine auffallend homogene Struktur.

Weitere Verunreinigungen entstanden beim Überbringen von Spurenmaterial auf die Spurenträger. Es ließ sich kaum vermeiden, daß vereinzelt Fasern des Filterpapiers beim Auspressen des gelösten Blutes mit auf den Objektträger gelangten. Eine Beeinträchtigung der Diagnosestellung war dadurch jedoch nicht gegeben.

Es wurde bereits darauf hingewiesen, daß sich zur Geschlechtsdiagnose am besten die Lymphozyten eignen. Die Ursache liegt vermutlich in der unterschiedlichen Dichte und dem Funktionszustand des Kernchromatins der verschiedenen weißen Blutzellen. Die Quinacrinoderivate färben nicht nur das Fluoreszenzkörperchen an, sondern in unterschiedlicher Stärke auch alle anderen Chromatinstrukturen des Zellkerns. Dadurch können Überlappungen oder Kontrastinterferenzen auftreten, die das Erkennen der Fluoreszenzkörperchen erschweren, bez. unmöglich machen (11). In den Fällen, in denen der Kontrast zwischen F - Body und Zellkern relativ schwach war, erwies sich das optische Schneiden als wertvolle Hilfe bei der Diagnosestellung. Grundsätzlich darf nur der Zellkern als positiv gewertet werden, der ein in Form und Größe typisches,

deutlich erkennbares Fluoreszenzkörperchen enthält. Der überraschend große Unterschied zwischen den Ergebnissen von Blutspuren gleichen Alters aber verschiedener Probanden läßt sich vermutlich auf das unterschiedliche Alter der Individuen zurückführen. Ein Zusammenhang mit der verschieden langen Aufbewahrung des Blutes in Alkohol konnte nicht festgestellt werden. Im Kapitel "Untersuchungsmaterial und Methode" wurde bereits darauf hingewiesen, daß sich das Blut nach der Entnahme zum Teil nur einen und zum Teil 3 Tage lang in alkoholischer Lösung befunden hatte, bevor es auf das Filterpapier aufgebracht worden war. Eine Differenz zwischen den untersuchten Stoffproben und den auf Filterpapier gelagerten Blutspuren war nicht festzustellen.

Die Färbung der Präparate wurde während der laufenden Untersuchungen ausschließlich mit Quinacrine mustard durchgeführt. Lediglich zu Vergleichszwecken wurden zwei Präparate mit Atebrin, das SCHWINGER (17) bei seinen Arbeiten benutzte, gefärbt. Es konnte, wie bereits erwähnt, kein bedeutender Unterschied in der Qualität der beiden Färbemittel festgestellt werden. Dieses Ergebnis ist nicht verwunderlich, da sich Atebrin und Quinacrine mustard nur durch die Substitution eines H - Atoms durch Cl in den beiden Äthylgruppen der Seitenkette unterscheiden. Auch die Verwendung einer essigsäuren Atebrinlösung (Lösung von 0,5% Atebrin in 2%iger Essigsäure) bringt den gleichen Effekt, wie das Quinacrine mustard und läßt keine Vorteile gegenüber einer einfachen Lösung von Atebrin in Aqua. dest. oder Mc Ilvaine's Puffer erkennen. (Untersuchungen von KIM, MAJEWSKI u. PFEIFFER) (11).

Es muß noch auf folgende interessante Feststellung hingewiesen werden: wurde der Lichtstrahl des Mikroskops längere Zeit auf eine Zelle mit y - Body gerichtet, so ließ die Leuchtkraft des Fluoreszenzkörperchens erheblich nach und verschwand schließlich ganz. Als mögliche Ursache kann die UV - Bestrahlung angegeben werden.

ZUSAMMENFASSUNG

Es wurde mittels Fluoreszenzfärbung das männliche Kerngeschlecht in menschlichen Blutzellen bestimmt. Die auf Filterpapier gelagerten Blutspuren wurden mit physiolog. Kochsalzlösung vom Papier abgelöst, mit Quinacrine mustard gefärbt und im Auflichtfluoreszenzmikroskop unter fluoreszenzfreier Ölimmersion betrachtet. An 120 Präparaten wurde nachgewiesen, daß innerhalb von 4 Monaten eine Geschlechtsdiagnose mit 100%iger Sicherheit gestellt werden kann.

LITERATURVERZEICHNIS

- (1) BARLOW, P., VOSA, C.G.: The Y-Chromosome in human spermatozoa.
Nature (London) 961 (1970).
- (2) BARR, M.L., BERTRAM, E.G.: A morphological distinction between
neurons of male and female and the
behavior of the nucleolar satellite
during accelerated nucleoprotein
synthesis.
Nature (London) 163, 676 (1949).
- (3) CASPERSSON, T., FABER, S.,
FOLEY, G.E., KUDYNOWSKI,
MODEST, E.J., SIMONSSON,
WAGH, U., ZECH, L.: Cheminal differentiation along
metaphase chromosomes.
Exp. Cell Res. 49, 219-222 (1968).
- (4) CASPERSSON, T., ZECH, L.,
MODEST, E.J., FOLEY, G.E.,
WAGH, U., SIMONSSON, E.: Chemical differentiation with
fluorescent alkylating agents in
VICIA FABa metaphase chromosomes.
Exp. Cell Res. 58 (1969) 128-140
- (5) CASPERSSON, T., ZECH, L.,
MODEST, E.J., FOLEY, G.E.,
WAGH, U., SIMONSSON, E.: DNA-binding fluorochromes for the
study of the organization of the
metaphase nucleus.
Exp. Cell Res. 58 (1969) 141-152.
- (6) DAVIDSON, W.M., SMITH, D.: A morphological sex difference in the
polymorphonuclear neutrophil leucocytes.
Brit. med. J. 1954 2, 6.

- (7) HELLWEG-FRÜND, S., KOSKE-WESTPHAL, T., FUCHS-MECKE, S., PASSARGE, E.:
Quinacrine mustard fluorescence of a second Y-chromosome in a Y - autosomal translocation.
Humangenetik 14, 133-136 (1972)
- (8) HELLWEG-FRÜND, S., KOSKE-WESTPHAL, T., FUCHS-MECKE, S., PASSARGE, E.:
Fluoreszenzmikroskopische Identifizierung von Anomalien des Y-Chromosoms.
Dtsch. med. Wschr. 97 (1972) 1650-1661
- (9) HELMER, R.:
Möglichkeiten und Methoden der zellkernmorphologischen Geschlechterkennung an Körpergeweben u. Sekretspuren.
Lübeck: Schmidt-Römhild 1970
- (10) HERBRICH, J. u. MEINHART, K.:
Fluoreszenzmikroskopischer Nachweis des Y-Chromosoms in isolierten Gewebszellkernen.
Ärztl. Lab. 18; 328-331 (1972)
- (11) KIM, A., BIER, L., MAJEWSKI, F., PFEIFFER, R. A.:
Fluorochromierung menschlicher Chromosomen mit Atebrin-Essigsäure.
Humangenetik 12; 257-260 (1971)
- (12) MENDE, S., ALONSO, A.:
Bestimmung des männlichen Kerngeschlechts in menschlichen Blutzellen.
Dtsch. med. Wschr. 26; 1122 (1971)
- (13) MOORE, K. L., GRAHAM, M. A., BARR, M. L.:
Surg. Gynec. Obstetr. 96 (1953)
- (14) PEARSON, P. L., BOBROW, M., VOSA, C. G.:
Technique for identifying Y-chromosomes in human interphase nuclei.
Nature (London) 226 (1970)
- (15) POLANI, P. E., MUTTON, D. E.:
Y-Fluorescence of interphase nuclei, especially circulating lymphocytes.
Brit. med. J. 1971/1 138-142

- (16) SCHAIDT, G., KRÜGER, A.: Die Geschlechtsbestimmung an Blutproben und Blutspuren männlicher Personen.
(Universität Erlangen-Nürnberg)
Geschlechtsbestimmung aus Blutspuren.
Z.Rechtsmedizin 70, 157-162 (1972)
- (17) SCHWINGER, E.: On the splitting of the Y-fluorescent body in man.
Humangenetik 14, 107-111 (1972)
- (18) SCHWINGER, E., PERA, F.: Y-body in hair roots.
Humangenetik 12, 79-80 (1971)
- (19) SCHWINGER, E., RAKEBRAND, E., MÜLLER, H.J., BÜHLER, E.M., TETTENBORN, U.: Y-body in hair roots.
Humangenetik 12, 79-80 (1971)

Mein herzlicher Dank gilt Herrn Professor Dr. Spann
und Herrn Dr. Liebhard für die Überlassung des Themas,
Herrn Dr. Tröger für seine fachlichen Ratschläge, und
Fräulein Schmidt für ihre stets freundliche Hilfe im
cytologischen Labor.

LEBENS LAUF

Als Tochter der Eheleute Walter und Emmy Heinhold, geb.v.Orff, wurde ich am 28.Dezember 1948 in München geboren.

Von 1955 bis 1959 besuchte ich die Volksschule an der Rotbuchenstraße in München. Anschließend trat ich in das Städtische Theodolindengymnasium über, wo ich nach 9 Schuljahren im Juni 1968 mein Abitur ablegte.

Im Winterhalbjahr 1968/69 studierte ich Lebensmittelchemie an der Ludwig-Maximilians-Universität in München. Im Sommerhalbjahr 1969 wechselte ich zum Studium der Zahnmedizin über. Nach 5 Semestern bestand ich im Sommerhalbjahr 1971 die zahnärztliche Vorprüfung an der Universität München. Ebenfalls in München legte ich im Sommerhalbjahr 1974 die zahnärztliche Prüfung ab.

